PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/03729 $\mathbf{A1}$ A61K 38/48 (43) Internationales 27. Januar 2000 (27.01.00) Veröffentlichungsdatum:

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/04406

(22) Internationales Anmeldedatum:

15. Juli 1998 (15.07.98)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): UR-SAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH [DE/DE]; Industriestrasse, D-66129 Saarbrücken (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MAURER, Rainer [DE/DE]; Schopenhauerstrasse 93, D-14129 Berlin (DE). ECKERT, Klaus [DE/DE]; Karower Chaussee 215, D-13125 Berlin (DE). GRABOWSKA, Edyta [PL/DE]; Aristotelessteig 6, D-10318 Berlin (DE). ESCHMANN, Klaus [DE/DE]; Lothringerstrasse 26, D-66271 Kleinblittersdorf (DE).
- (74) Anwalt: STRAUS, Alexander; Kirschner & Kurig, Sollner Strasse 38, D-81479 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,

Veröffentlicht

SN, TD, TG).

Mit internationalem Recherchenbericht.

- (54) Title: USE OF BROMELAIN PROTEASES FOR INHIBITING BLOOD COAGULATION
- (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON BROMELAINPROTEASEN ZUR HEMMUNG DER BLUTGERINNUNG

(57) Abstract

The invention relates to the use of bromelain proteases for inhibiting the blood coagulation system, notably for stimulating plasmin production, inhibiting fibrin production and inhibiting the adhesion of human thrombocytes to endothelial cells. The basic proteases, which can be isolated from pure bromelain, have proved to be especially suitable proteases.

(57) Zusammenfassung

Diese Erfindung betrifft die Verwendung von Bromelainproteasen zur Hemmung des Blutgerinnungssystems, insbesondere zur Stimulation der Plasmin-Bildung, der Hemmung der Fibrin-Bildung und der Hemmung der Adhäsion humaner Thrombozyten an Endothelzellen. Als besonders geeignete Proteasen haben sich insbesondere die aus Rohbromelain isolierbaren, basischen Proteasen erwiesen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JР	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verwendung von Bromelainproteasen zur Hemmung der Blutgerinnung

1

5

Diese Erfindung betrifft die Verwendung von Bromelainproteasen, vorzugsweise basischer Bromelainproteasen zur Hemmung des Blutgerinnungssystems, insbesondere zur Stimulation der Plasmin-Bildung, der Hemmung der Fibrin-Bildung und der Hemmung der Adhäsion humaner Thrombozyten an Endothelzellen.

10

15

20

25

30

35

Bromelain ist ein aus Pflanzen der Familie Bromeliaceae isolierbares Gemisch unterschiedlichster Proteine, dessen genaue Zusammensetzung aufgrund der Komplexität und Vielfalt der darin enthaltenen Komponenten noch nicht vollständig charakterisiert werden konnte. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Bromelain verschiedene Phosphatasen, Cellulasen, Glycosidasen, Cystein-Proteasen und deren Peptid-Inhibitoren, sowie weitere, noch nicht näher identifizierte Komponenten enthält. Die stoffliche und mengenmäßige Zusammensetzung von Bromelain variiert jedoch in Abhängigkeit von der Herkunft und dem Isolierungsverfahren aus der jeweiligen Quelle, so daß unterschiedliche Verfahren zur Isolierung des Rohprodukts, dessen Standardisierung sowie zur Aufreinigung bestimmter, darin enthaltener Komponenten entwickelt wurden.

Einige der Komponenten von Bromelain konnten bereits näher identifiziert werden. So wird von Murachi et al., in The Journal of Biological Chemistry <u>1</u> (1960), 99-107 berichtet, daß Bromelain mindestens 5 ähnlich wirkende Proteasen mit unterschiedlicher Substratspezifität und unterschiedlichem pH-Optimum enthält.

Bei mit Bromelain durchgeführten Studien wurde weiter gefunden, daß sich dieses Gemisch auch als Arzneimittel zur Behandlung verschiedener Erkrankungszustände einsetzen läßt.

So wird in der DE 41 30 221 die Verwendung von Papain und/oder Trypsin, von dem Bromelaingemisch abgeleitete, bestimmte proteolytische Enzyme, zur Herstellung eines Arzneimittels vorgeschlagen, das zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen geeignet sein soll. Gemäß dieser Patentschrift soll das Papain bzw. das Trypsin auf bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligte Proteine einwirken, die eine C_H2-Domäne aufweisen.

In der DE 43 02 060 wird weiter die Verwendung von Bromelain als Gemisch zur Krebstherapie und/oder Metastasen-Prophylaxe gelehrt. Dabei wird davon ausgegangen, daß Bromelain auf CD44, ein auf unterschiedlichen Zellen des Organismus vorkommendes, stark glycosyliertes Oberflächenprotein einwirkt, dem eine Rolle bei der Tumorentwicklung nachgesagt wird.

In der WO 95/00169 wird die Isolierung und Charakterisierung einer Protease aus dem Bromelaingemisch erläutert, die auf den Syntheseweg cyclischer Nucleotide einwirkt. Das als "Stem Bromelain Protease" bezeichnete Enzym weist 213 Aminosäuren auf und soll Erkrankungen, wie der Tumorentstehung, Atherosclerose oder auch bakteriellen Infektionen vorbeugen können.

Aufgrund der Entwicklung auf dem Gebiet der Aufreinigungstechniken konnten weitere Komponenten aus dem Bromelaingemisch isoliert und teilweise auch charakterisiert werden. So wurde von Eckert et al., in The Journal of Protein Chemistry 14 (1995), 41-52 offenbart, daß Bromelain mindestens 8 basische Proteasen enthält, die über FPLC-Kation-Austauschchromatographie fraktionert werden konnten. Auch zwei Formen saurer Proteasen konnten nachgewiesen werden (Maurer et al., Journal of Protein Chemistry 17 (1998), 351-361.

20

25

30

5

10

15

Obwohl für Bromelain bereits verschiedenste medizinische Anwendungsgebiete erkannt wurden, besteht ein Bedarf, weitere Anwendungen für Bromelain aufzufinden. Dabei wäre es aufgrund des nicht vollständig verstandenen Zusammenwirkens der einzelnen Komponenten im Gemisch wünschenswert, für das jeweilige Einsatzgebiet nicht das Gemisch selbst einzusetzen, sondern nur die für den jeweiligen Zweck verantwortliche Komponente des Gemisches. Dabei tritt jedoch ein Problem auf, da nicht vorhergesagt werden kann, ob einzelne Komponenten im isolierten Zustand ohne andere, im Bromelaingemisch noch vorhandene zusätzliche Stoffe selbst wirksam sind, oder ob diese vielmehr zusätzliche, im Bromelaingemisch vorhandene, jedoch noch nicht erkannte Komponenten als Hilfsstoffe benötigen.

Eine Aufgabe der Erfindung besteht daher darin, weitere Verwendungsmöglichkeiten für Bromelain, insbesondere deren Komponenten aufzuzeigen.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, die jeweils für den medizinischen Zweck verantwortliche Komponente(n) aufzufinden und einer medizinischen Verwendung zugänglich zu machen.

WO 00/03729 PCT/EP98/04406 3

Die Erfinder haben umfangreiche Studien durchgeführt und überraschenderweise gefunden, daß allein mit im Bromelaingemisch vorhandenen Proteasen, ohne weitere, in diesem Gemisch vorhandene Komponenten eine Hemmung der Blutgerinnung erzielt werden kann.

5

Die vorstehend aufgeführte Aufgabe wird daher dadurch gelöst, indem die im Bromelaingemisch vorhandenen Proteasen zur Hemmung der Blutgerinnung verwendet werden.

- Es hat sich gezeigt, daß durch die Bromelainproteasen insbesondere die Bildung von 10 Plasmin gefördert, während die Bildung von Fibrin sowie die Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen, Vorgänge, die bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle spielen, gehemmt wird.
- 15 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden insbesondere basische Proteasen, vorzugsweise die gemäß dem von Eckert et al., in The Journal of Protein Chemistry 14 (1995), 41 - 52 beschriebenen Verfahren als Fraktionen F4, F5 oder, mehr bevorzugt, F9 gewonnenen Bromelainproteasen zu dem angegebenen Zweck eingesetzt.

20

Die in der Fraktion F4 enthaltene Protease weist ein Molekulargewicht von etwa 24,4 KDa auf und besitzt ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von ca. 4 bis 5,5. Die Protease umfaßt weiter die folgende Aminosäuresequenz:

25

30

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

Die in der Fraktion F5 enthaltene Protease weist ein Molekulargewicht von etwa 24,5 KDa auf und besitzt ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von ca. 3,5 bis 5. Die Protease umfaßt weiter die folgende Aminosäuresequenz:

> Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

Die in der Fraktion F9 enthaltene Protease weist ein Molekulargewicht von etwa 23,4-KDa auf und besitzt ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von ca. 6 bis 8. Die Protease umfaßt weiter die folgende Aminosäuresequenz:

5

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Gly

Es hat sich nun überraschenderweise gezeigt, daß eine wirksame Hemmung der

Blutgerinnung unter Verwendung von Bromelainproteasen erreicht werden kann, und
daß diese Hemmung lediglich mit den aus dem Bromelaingemisch isolierten Proteasen
erreichbar ist, ohne daß dabei andere, im Bromelaingemisch vorhandene, zusätzliche
Komponenten eine Rolle spielen würden.

Die Proteasen können einem Subjekt in einer bereits für das Bromelaingemisch bekannten Art und Weise verabreicht werden, d.h. durch intravenöse oder intraperitoneale Gabe oder vorzugsweise oral, wobei die Wirkstoffe dann mit im Stand der Technik gebräuchlichen Exzipienten formuliert werden, um die Proteasen in aktiver Form durch den Magen-Darm-Trakt zu bringen und eine systemische Verfügbarkeit zu gewährleisten.

Die Proteasen können nach herkömmlichen Verfahren isoliert werden. Insbesondere eine Aufreinigung, wie von Eckert et al., in The Journal of Protein Chemistry 14 (1995), 41 - 52 und von Maurer et al., in The Journal of Protein Chemistry 17 (1998) angegeben, kann dazu eingesetzt werden. Nach Aufreinigung können die Proteasen ansequenziert werden und das entsprechende Gen mittels molekularbiologischer Methoden aus dem Genom von beispielsweise der Ananas isoliert werden. Mittels molekularbiologischer Methoden kann dann in herkömmlicher Art und Weise ein rekombinantes Protein bereitgestelt werden.

30

25

Die Erfindung wird nun anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben, die lediglich zur Erläuterung dienen und nicht als Beschränkung der vorliegenden Erfindung gedacht sein sollen.

Die in der vorliegenden Erfindung zum Einsatz kommenden Proteasen, insbesondere die basischen Proteasen werden isoliert wie von Eckert et al., in The Journal of Protein Chemistry 14 (1995), 41 - 52 sowie von Maurer et al., in The Journal of Protein

WO 00/03729 PCT/EP98/04406 5

Chemistry <u>17</u> (1998) angegeben. Der Inhalt dieser Druckschriften wird hiermit vollumfänglich in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Anmeldung miteinbezogen.

Als Beispiel der Auswirkungen von Bromelainproteasen auf die Blutgerinnung wird stellvertretend die gemäß vorstehenden Dokumenten isolierte Fraktion F9 herangezogen.

Wirkungen von Bromelain F9 auf die Fibrinolyse

10

15

25

30

35

5

Zum Nachweis der Wirkung wird eine Bestimmungsmethode eingesetzt, die auf der Verwendung eines chromogenen Substrates in einem photometrischen Nachweissystem basiert. Mit dem verwendeten Testkit Berichrom-Plasminogen (Fa. Behring) wird das Plasminogen der Probe durch Streptokinase in einen Komplex überführt. In dem kinetischen Test kann die Freisetzung von Plasmin durch Zugabe des Plasmin-Substrates über die Extinktionszunahme quantitativ erfaßt werden.

Beispiel 1

In diesem Experiment wird die fibrinolytische Aktivität von Bromelain F9 der von Bromelain Base Powder (Rohprodukt) und Streptokinase gegenübergestellt.

Ausgangsmaterial für die Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität der zu testenden Protease Bromelain F9 ist das Citratplasma gesunder Spender. 9 Teile Venenblut werden mit 1 Teil Natriumcitratlösung (0,11 Mol/l) gemischt und anschließend 10 min (1500 x g) zentrifugiert. Streptokinase, Urokinase, tPA, Plasmin-Substrat, die Testsubstanz Bromelain F9 sowie die Kunststoffküvetten werden auf 37°C in einem Inkubator vortemperiert. In die Meßküvette werden 20 ml der Plasma-probe, 500 ml (gebrauchsfertige Streptokinase Test-Kit-Lösung). Urokinase (1U/ml). tPA = Actilyse® (0.58 x 106 I.E./ml) oder der Bromelain F9 - Lösung pipettiert. Nach Vermischung wird die Lösung 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 ml Plasmin-Substrat (gebrauchsfertige Test-Kitlsösug) gestartet. Die Extinktion bei 405 nm wird in Abhängigkeit von der Probenkonzentration und der Zeit vermessen.

Tabelle 1
Fibrinolytische Aktivität von Streptokinase, Bromelain F9
und Bromelain Base Powder im Plasminogen-Test

Zeit (s)	Streptokinase (Kit)	Brom	Bromelain Base Powder		
		5	10	30	50 μg/ml
30	0,284	0,23	0,315	0,304	0,356
60	0,523	0,424	0,485	0,559	0,449
120	0,741	0,610	0,611	0,795	0,507
180	1,078	0,929	0,929	1,036	0,551

5

10

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, zeigt Bromelain F9 im kinetischen Test eine der Streptokinase vergleichbare Wirkung. Die Wirkung von Bromelain F9 ist zeit- und konzentrationsabhängig, der Maximaleffekt wird bei 30 mg/ml (1.0 U/mg) erreicht. Bromelain F9 ist bereits bei einer Konzentration von 5mg/ml (E = 0.929) der Wirkung des Bromelain-Base Powder (0.4 U/mg) bei einer Konzentration von 50 mg/ml (E = 0.55) überlegen.

Beispiel 2

Das Ziel dieses Experiments besteht darin, zu überprüfen, ob und inwieweit die Kombination von Bromelain F9 mit Streptokinase der Wirkung von Streptokinase alleine überlegen ist.

20 <u>Tabelle 2</u>
Fibrinolytische Aktivität von Streptokinase alleine
und in Kombination mit Bromelain F9 im Plasminogen-Test

Zeit (s)	Streptokinase (Kit)	Streptokinase + Bromelain F9
30	0,284	0,246
60	0,523	0,479
120	0,741	0,728
180	1,078	0,939

7

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, ist die Kombination von Bromelain F9 (10 mg/ml) mit Streptokinase der Wirkung von Streptokinase alleine im Plasminogentest nicht überlegen.

Dies kann dahingehend interpretiert werden, daß die Wirkung von Bromelain F9 auf die Fibrinolyse (Bildung von Plasmin) ähnlich ausgeprägt ist, wie die von Streptokinase, jedoch 10- fach (bezogen auf die chemische Konzentration) über der von Bromelain Base Powder liegt. Die Wirkung von Bromelain F9 ist konzentrations-und zeitabhängig. Die Kinetiken entsprechen denen von Streptokinase alleine in diesem System.

10

15

Beispiel 3

In diesem Experiment wird ein Vergleich der fibrinolytischen Aktivitäten von Urokinase, Gewebsplasminogenaktivator (tPA) und deren Kombinationen mit Bromelain F9 durchgeführt.

<u>Tabelle 3</u>
Fibrinolytische Aktivität von Urokinase, tPA alleine und der Kombinationen mit Bromelain F9 im Plasminogen-Test

20

Zeit (s)	Urokinase (1U/ml)	tPA 0,58x10 ⁶ I.E./ml	Urokinase + Bromelain F9 (10 μg/ml)	tPA + Bromelain F9 (10 μg/ml)
30	0,2216	0,2315	0,2757	0,2417
60	0,3517	0,3215	0,3888	0,3124
120	0,5830	0,4469	0,5244	0,4680
180	0,7970	0,7899	0,6640	0,7553

Wie aus dem Vergleich der in Tabelle 1 und Tabelle 3 gezeigten Werte hervorgeht, bewirkt Streptokinase in diesem Testsystem im Vergleich zu Urokinase und tPA eine stärkere Plasminogen-Umsetzung. Die Wirkung von 30 mg/ml Bromelain F9 (Tabelle 1, 3) entspricht der Wirkung von Streptokinase und ist der Wirkung von Bromelain Base Powder überlegen. Bei Kombination von Bromelain F9 mit vorstehenden Plasminogen-Aktivatoren sind keine stärkeren Wirkungen im Vergleich zur alleinigen Wirkung von Urokinase und tPA, ebenso wie für Streptokinase (Tabelle 2) nachweisbar.

Wirkung von Bromelain F9 auf die Fibrin-Bildung aus humanem Plasma von gesunden Spendern

Hierbei soll überprüft werden, ob und inwieweit Bromelain F9 die Thrombin-induzierte Fibrin-Bildung aus humanem Plasma beeinflußt.

Beispiel 4

5

20

30

35

Ausgangsmaterial ist Citratplasma gesunder Spender, welches mit Bromelain F9 bei 10 37°C vorinkubiert und anschließend mit Thrombin versetzt wird. Pro Testansatz werden zu 0,05 ml Citratplasma 0,02 ml Proteaselösung pipettiert und für 1 Std inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 0.01 ml Thrombin (0.2 U/ml) und eine Inkubation von 10 min im Wasserbad bei 37°C. Die Fibrinbildung wird semiquantitativ, organoleptisch unter dem Invertmikroskop (20-fache Vergrößerung) bewertet. 15

Dabei wird gefunden, daß Bromelain F9 (100 mg/ml) ebenso wie Streptokinase die Thrombin-induzierte Fibrinbildung aus Citratplasma vollständig verhindert. Auf der Basis der eingesetzten chemischen Konzentration ist Bromelain F9 um den Faktor 2 wirksamer als Bromelain Base Powder. Dagegen ist Papain (100 mg/ml, spezifische Aktivität 7,1 U/mg) unter diesen Bedingungen wirkungslos.

Wirkung von Bromelain F9 auf die Adhäsion von humanen Thrombozyten an **BKEz-7 Rinder-Endothelzellen** 25

Aus humanem Vollblut isolierte Thrombozyten werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2,7-Bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluoresceinacetoxymethylester Permanente BKEz-7 Rinderaorta-Zellen (11.-22. Passage) werden zu 60.000 Zellen pro Vertiefung in eine 96 Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht inkubiert. Für den Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsions-Assay sind 5x10⁷ Thrombozyten nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37°C optimal. Die Entfernung der nichtgebundenen Thrombozyten erfolgt durch zweimaliges Waschen der Zellen mit KRB-Puffer (Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 5,6 mMol Glucose + 1 % BSA).

Beispiel 5

Im Versuchsansatz wird geprüft, welche Wirkung Bromelain F9 auf bereits adhärente Thrombozyten aufweist. Nach Durchführung des Thrombozyten-EndothelzellAdhäsions-Assays werden die adhärenten Thrombozyten (stimuliert mit 0.2 U/ml Thrombin) mit Bromelain F9 (0.01 mg/ml) für 10 min bei 37°C inkubiert. Als Vergleich wird Bromelain Base Powder (0.1 mg/ml) mitgeführt. Die resultierenden Thrombozyten-Bindungen an die Endothelzellen werden mit denen der Protease-unbehandelten Proben verglichen. Wie aus der Tabelle 4 ersichtlich, reduziert Bromelain F9 die Thrombozytenbindung um 32% (68% Bindung), während Bromelain Base Powder erst bei einer Konzentration von 0.1 mg/ml wirksam ist, mit einer Abnahme der Thrombozytenbindung um 40% (60% Bindung).

10

5

Tabelle 4

Adhäsion von Thrombozyten an BKEz-7 Endothelzellen unter dem Einfluß von Bromelain F9

15

- Thrombin	+ Thrombin (0.2 U/ml)	+Bromelain F9 (0.01 μg/ml)	+Bromelain Base Powder (0.1 μg/ml)
	% A	dhäsion	
61*	100	68*	60*

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Thrombin-stimulierten, adhärierten Thrombozyten werden auf 100% normiert;

Beispiel 6

Isolierte humane Thrombozyten (5x10⁷/ml) werden mit Bromelain F9 und Bromelain Base Powder bei unterschiedlichen Konzentrationen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Proteasen werden durch Zentrifugation (1000 x g) und Waschen entfernt, die Thrombozyten in 1 ml KRB-Puffer (siehe vorstehend) resuspendiert, mit 0.2 U/ml Thrombin inkubiert und in dem Adhäsions-Assay an BKEz-7 Zellen eingesetzt. Die Resultate sind in Tabelle 5 dargestellt.

^{*} p<0.001 (t-Test); im Vergleich zu den adhärenten, Thrombin-stimulierten 20 Thrombozyten sind diese Unterschiede statistisch signifikant.

Tabelle 5

Adhäsion von Thrombozyten an BKEz-7 Endothelzellen unter dem Einfluß von Bromelain F9 und Bromelain Base Powder

ı

- Thrombin	+ Thrombin (0,2 U/ml)	+Bromelain F9 (μg/ml)		+Bromelain Base Powder
		0,005	0,01	$0,1 \mu g/ml$
		% Adhäsion	1	
61*	100	86*	75*	69*

^{*} p< 0.001 (t-Test); im Vergleich zu den adhärenten, Thrombin-stimulierten Thrombozyten sind diese Unterschiede statistisch signifikant.

10

15

Wie aus der Tabelle 5 ersichtlich, zeigt Bromelain F9 eine konzentrationsabhängige Hemmung der Thrombozyten-Adhäsion an die Endothelzellen. Eine geringere Abnahme der Thrombozyten-Adhäsion wird für Bromelain Base Powder bei einer Konzentration von 0.1 mg/ml bestimmt.

Patentansprüche

- 1. Verwendung von Bromelainproteasen zur Hemmung der Blutgerinnung.
- 5 2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Plasmin-Bildung stimuliert wird.
 - 3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Fibrin-Bildung gehemmt wird.
- Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Adhäsion von Thrombozyten an
 Endothelzellen gehemmt wird.
 - Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bromelainproteasen basische Bromelainproteasen sind.
- 15 6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die basische Bromelainprotease eine Protease ist, die:
 - ein Molekulargewicht von etwa 24,4 KDa aufweist,
 - ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von ca. 4 bis 5,5 besitzt, und
- die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

- 7. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die basische Bromelainprotease eine Protease ist, die:
 - ein Molekulargewicht von etwa 24,5 KDa aufweist,
 - ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von ca. 3,5 bis 5 besitzt, und
- odie folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn WO 00/03729 PCT/EP98/04406

8. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die basische Bromelainprotease eine Protease ist, die:

- ein Molekulargewicht von etwa 23,4 KDa aufweist,
- 5 ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von ca. 6 bis 8 besitzt, und
 - die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser

Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Gly

- 9. Arzneimittel zur Hemmung der Blutgerinnung, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel eine oder mehrere Bromelainproteasen enthält.
- 15 10. Arzneimittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Bromelainproteasen basische Bromelainproteasen sind.
 - 11. Arzneimittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Bromelainprotease eine basische Bromelainprotease ist, ausgewählt unter einer Protease nach einem der Ansprüche 6 bis 8.
 - 12. Arzneimittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Bromelainprotease eine rekombinante Bromelainprotease ist.

SEQUENZ - LISTINGS

ALLGEMEINE ANGABEN:

ANMELDER:

NAME: Ursapharm Arzneimittel Gmbh

STRASSE: Industriestrasse
ORT: SAARBRÜCKEN
LAND: Deutschland

POSTLEITZAHL: 66129

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

Verwendung von Bromelainproteasen zur Hemmung der Blutgerinnung

ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

COMPUTER LESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER: Diskette

COMPUTER: IBM-PC-kompatibel BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS

ANGABEN ZUR SEQ ID NR.1

SEQUENZKENNZEICHEN:

LÄNGE: 20

ART: Aminosäuren

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS: Ananas (Bromeliacea)

SEQUENZBESCHREIBUNG:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr Ser Val

1 5 10 15

Lys Asn Gln Asn

		•
		`
		•

20

ANGABEN ZUR SEQ ID NR.2

SEQUENZKENNZEICHEN:

LÄNGE: 20

ART: Aminosäuren

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS : Ananas (Bromeliacea)

SEQUENZBESCHREIBUNG:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser Gly Ala Val Thr Ser Val

10

15

Lys Asn Gln Gly

	•	

Interna al Application No

			PCT/EP 98/04406
A. CLASSIF	FICATION OF SUBJECT MATTER A61K38/48		-
2.00			
According to	International Patent Classification (IPC) or to both national classificat	tion and IPC	
B. FIELDS		n eymhole)	
Minimum do IPC 6	cumentation searched (classification system followed by classificatio $A61K$	n symbols)	
Documentat	ion searched other than minimum documentation to the extent that su	ich documents are inclu	ded in the fields searched
Electronic di	ata base consulted during the international search (name of data bas	e and, where practical,	search terms used)
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele	evant passages	Relevant to claim No.
Х	TAUSSIG S J ET AL: "Bromelain, t complex of pineapple (ananas como its clinical application. An upda JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY,	sus) and te"	1-3,9
	vol. 22, no. 2, 1988, page 191-20 XP002097864	13	
Υ	see abstract		5-8, 10-12
	see page 193, line 21 - line 25 see page 194, line 40 - page 195, see page 195, line 38 - page 196, see page 197, line 35 - page 199, see page 200, line 5 - line 19	line 4	
!		-/	
X Fur	ther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family	members are listed in annex.
ļ '	ategories of cited documents : sent defining the general state of the art which is not	or priority date and	olished after the international filing date and not in conflict with the application but and the principle or theory underlying the
consi	dered to be of particular relevance document but published on or after the international	invention "X" document of partic	cular relevance; the claimed invention ered novel or cannot be considered to
"L" docum which citatio	ent which may throw doubts on priority claim(s) or n is cited to establish the publication date of another on or other special reason (as specified)	involve an invention "Y" document of particle cannot be consider	ive step when the document is taken alone sular relevance; the claimed invention ered to involve an inventive step when the
other	nent referring to an oral disclosure, use, exhibition or rneans nent published prior to the international filling date but than the priority date claimed	document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "8" document member of the same patent family	
	actual completion of the international search	Date of mailing of	the international search report
1	25 March 1999	13/04/1	1999
Name and	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2	Authorized officer	
	NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Stein,	A

1



Interna al Application No PCT/EP 98/04406

2.42	ACCUMENTS CONCERNED TO BE SELECTED.	FC1/E1 98/04400
C.(Continu Category	Citation of document. with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HARRACH T ET AL: "ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF BASIC PROTEINASES FROM STEM BROMELAIN" JOURNAL OF PROTEIN CHEMISTRY, vol. 14, no. 1, January 1995, pages 41-52, XP002069063 cited in the application See the whole document, in particular: see abstract see page 48; table 2 see page 49; figure 8	5-8, 10-12
X	SUNNY M C ET AL: "Effect of fabrication, sterilization and mediators-blood compatibility of polyurethanes" JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS, vol. 6, no. 3, January 1992, page 261-273 XP002097865 see abstract see page 262, line 14 - line 24 see page 271, line 10 - line 31	1,4
X	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-019644 XP002097957 & JP 63 295515 A (KAO CORP), January 1988	1,2,9
Y	see abstract	5-8, 10-12
E	WO 98 38291 A (MYNOTT TRACEY LEHANNE; CORTECS UK LTD (GB); PEEK KEITH (GB); ENGWE) 3 September 1998 see abstract see page 1, line 3 - line 5 see page 3, line 22 - line 10 see page 5, line 24 - line 27 see page 8, line 12 - line 28 see page 10, line 3 - line 9 see page 12, line 1 - line 21 see claims 1-19	1,5,8-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP 98/04406

Box I	Observati ns where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This inte	mational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1. X	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
	Observation: Although Claim(s) 1-8 relate(s) to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2.	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This Inte	emational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all
'-	searchable claims.
2.	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. al Application No PCT/EP 98/04406

				• •	date
0 9838291	Α	03-09-1998	AU	6303698 A	18-09-1998
			AU	6303798 A	18-09-1998
			AU	6303898 A	18-09-1998
			WO	9838319 A	03-09-1998
			WO	9838320 A	03-09-1998
		, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,		AU AU WO	AU 6303798 A AU 6303898 A WO 9838319 A

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interna. .les Aktenzeichen

		PCT/E	EP 98/04406
A. KLASSI IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES A61K38/48		
Nach der In	ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klas	ssifikation und der IPK	
	RCHIERTE GEBIETE		
	ner Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbo $$ $$ $$ $$ $$ $$ $$ $$ $$ $$	ole)	
Recherchie	rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, so	weit diese unter die recherchierter	n Gebiete fallen
Während de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (N	ame der Datenbank und evtl. ven	wendete Suchbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	e der in Betracht kommenden Teile	Betr, Anspruch Nr.
X	TAUSSIG S J ET AL: "Bromelain, t complex of pineapple (ananas como its clinical application. An upda JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, Bd. 22, Nr. 2, 1988, Seite 191-20	sus) and te"	1-3,9
Y	XP002097864 siehe Zusammenfassung		5-8, 10-12
	siehe Seite 193, Zeile 21 - Zeile siehe Seite 194, Zeile 40 - Seite Zeile 7 siehe Seite 195, Zeile 38 - Seite	9 195,	
	Zeile 4 siehe Seite 197, Zeile 35 - Seite Zeile 11 siehe Seite 200, Zeile 5 - Zeile	199,	
	,	·/ 	
		,	
	tere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehrmen	X Siehe Anhang Patenttam	lilie
"Besondere aber n "E" älteres Anmel "L" Veröffer schein anderr soll oc ausge "O" Veröffer eine B "P" Veröffer dem b	e Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen intlichung, die den alfgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist. Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Idedatum veröffentlicht worden ist. Intlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft ernen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer en im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden ber die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie tührt) intlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht intlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach eeanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	oder dem Prioritätsdatum ver- Anmeldung nicht kollidiert, so Erfindung zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besondel kann allein aufgrund dieser V- erfinderischer Tätigkeit beruhe "Y" Veröffentlichung von besondel kann nicht als auf erfinderisch werden, wenn die Veröffentlic Veröffentlichungen dieser Kat diese Verbindung für einen Fa	rer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung ner Tätigkeit beruhend betrachtet ihung mit einer oder mehreren anderen tegone in Verbindung gebracht wird und achmann naheliegend ist derselben Patentfamilie ist
ļ	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internatio	nalen Recherchenberichts
	5. März 1999		
Name und f	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bedienstete Stein, A	r





Interna des Aktenzeichen PCT/EP 98/04406

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HARRACH T ET AL: "ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF BASIC PROTEINASES FROM STEM BROMELAIN" JOURNAL OF PROTEIN CHEMISTRY, Bd. 14, Nr. 1, Januar 1995, Seiten 41-52, XP002069063 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument besonders: siehe Zusammenfassung siehe Seite 48; Tabelle 2 siehe Seite 49; Abbildung 8	5-8, 10-12
X	SUNNY M C ET AL: "Effect of fabrication, sterilization and mediators-blood compatibility of polyurethanes" JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS, Bd. 6, Nr. 3, Januar 1992, Seite 261-273 XP002097865 siehe Zusammenfassung siehe Seite 262, Zeile 14 - Zeile 24 siehe Seite 271, Zeile 10 - Zeile 31	1,4
X	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-019644 XP002097957 & JP 63 295515 A (KAO CORP), Januar 1988	1,2,9
Υ	siehe Zusammenfassung	5-8, 10-12
E	WO 98 38291 A (MYNOTT TRACEY LEHANNE; CORTECS UK LTD (GB); PEEK KEITH (GB); ENGWE) 3. September 1998 siehe Zusammenfassung siehe Seite 1, Zeile 3 - Zeile 5 siehe Seite 3, Zeile 22 - Zeile 10 siehe Seite 5, Zeile 24 - Zeile 27 siehe Seite 8, Zeile 12 - Zeile 28 siehe Seite 10, Zeile 3 - Zeile 9 siehe Seite 12, Zeile 1 - Zeile 21 siehe Ansprüche 1-19	1,5,8-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04406

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
 Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 1-8 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen K rpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:
Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat 3s Aktenzeichen
PCT/EP 98/04406

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der	Mitglied(er) der	Datum der
	Veröffentlichung	Patentfamilie	Veröffentlichung
WO 9838291 A	03-09-1998	AU 6303698 A AU 6303798 A AU 6303898 A WO 9838319 A WO 9838320 A	18-09-1998 18-09-1998 18-09-1998 03-09-1998

13x2

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES		die Übermittlung des internationalen
P20241 Dr.Kö	VORGEHEN	Recherchenberichts (F zutreffend, nachsteher	Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit nder Punkt 5
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anme (Tag/Monat/Jahr)	dedatum	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
PCT/EP 98/04406	15/07/1	1998	
Anmelder	<u> </u>		I
URSAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH	let al.		
Dieser internationale Recherchenbericht wurd			erstellt und wird dem Anmelder gemäß
Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Int	emationalen Buro uber	mittert.	
Dieser internationale Recherchenbericht umfa	ißt insgesamt 4	Blätter.	
	•	liesem Bericht genannter	n Unterlagen zum Stand der Technik bei.
1 Grundlage des Berichts			
Grundlage des Berichts a. Hinsichtlich der Sprache ist die inter	rnationale Recherche a	uf der Grundlage der inte	ernationalen Anmeldung in der Sprache
durchgeführt worden, in der sie eing			
Die internationale Recherche Anmeldung (Regel 23.1 b)) o		einer bei der Behörde ei	ngereichten Übersetzung der internationalen
			Aminosäuresequenz ist die internationale
Recherche auf der Grundlage des S X in der internationalen Anmel	•	•	
zusammen mit der internation	•		ngereicht worden ist.
bei der Behörde nachträglich	h in schriftlicher Form e	ingereicht worden ist.	
bei der Behörde nachträglich	h in computerlesbarer F	orm eingereicht worden i	ist.
Die Erklärung, daß das nach internationalen Anmeldung i			oll nicht über den Offenbarungsgehalt der gt.
Die Erklärung, daß die in con wurde vorgelegt.	mputerlesbarer Form e	rfaßten Informationen dei	m schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen,
2. X Bestimmte Ansprüche hab	oen sich als nicht rech	ı erchierbar erwiesen (si	iehe Feld I).
3. Mangelnde Einheitlichkeit			·
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfin	•	hmint	
wird der vom Anmelder eing	•	•	
wurde der Wortlaut von der l	Benorde wie loigt lestgi	esetzt.	
5 Hispich High day 7.			
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung	orajahta Mortlaut aana	ta con i cut	
	egel 38.2b) in der in Feld e innerhalb eines Monat	d III angegebenen Fassu	ng von der Behörde festgesetzt. Der bsendung dieses internationalen
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen is	st mit der Zusammenfa	ssung zu veröffentlichen:	Abb. Nr
wie vom Anmelder vorgesch	nlagen		keine der Abb.
weil der Anmelder selbst kei	ine Abbildung vorgesch	lagen hat.	
weil diese Abbildung die Erfi	indung besser kennzeid	hnet.	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ernationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04406

Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1 Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt: | X | Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 1-8 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen K rpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind. Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1) Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält: Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen er-Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

a. Klassifizierung des anmeldungsgegenstandes IPK 6 A61K38/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Х	TAUSSIG S J ET AL: "Bromelain, the enzyme complex of pineapple (ananas comosus) and its clinical application. An update" JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, Bd. 22, Nr. 2, 1988, Seite 191-203 XP002097864	1-3,9
Y	siehe Zusammenfassung siehe Seite 193, Zeile 21 - Zeile 25 siehe Seite 194, Zeile 40 - Seite 195, Zeile 7 siehe Seite 195, Zeile 38 - Seite 196, Zeile 4 siehe Seite 197, Zeile 35 - Seite 199, Zeile 11 siehe Seite 200, Zeile 5 - Zeile 19 -/	5-8, 10-12

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie
Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-	Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf
scheinen zu lassen oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer	erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derseßben Patentfamilie ist
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
25. März 1999	13/04/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Riiswiik	Bevollmächtigter Bediensteter
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Stein, A

INTERNATIONALE ECHERCHENBERICHT



Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Υ	HARRACH T ET AL: "ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF BASIC PROTEINASES FROM STEM BROMELAIN" JOURNAL OF PROTEIN CHEMISTRY, Bd. 14, Nr. 1, Januar 1995, Seiten 41-52, XP002069063 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument besonders: siehe Zusammenfassung siehe Seite 48; Tabelle 2 siehe Seite 49; Abbildung 8	5-8, 10-12
X	SUNNY M C ET AL: "Effect of fabrication, sterilization and mediators-blood compatibility of polyurethanes" JOURNAL OF BIOMATERIALS APPLICATIONS, Bd. 6, Nr. 3, Januar 1992, Seite 261-273 XP002097865 siehe Zusammenfassung siehe Seite 262, Zeile 14 - Zeile 24 siehe Seite 271, Zeile 10 - Zeile 31	1,4
X	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-019644 XP002097957	1,2,9
Υ	& JP 63 295515 A (KAO CORP), Januar 1988 siehe Zusammenfassung	5-8, 10-12
Ε	WO 98 38291 A (MYNOTT TRACEY LEHANNE; CORTECS UK LTD (GB); PEEK KEITH (GB); ENGWE) 3. September 1998 siehe Zusammenfassung siehe Seite 1, Zeile 3 - Zeile 5 siehe Seite 3, Zeile 22 - Zeile 10 siehe Seite 5, Zeile 24 - Zeile 27 siehe Seite 8, Zeile 12 - Zeile 28 siehe Seite 10, Zeile 3 - Zeile 9 siehe Seite 12, Zeile 1 - Zeile 21 siehe Ansprüche 1-19	1,5,8-11

INTERMATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

ational Application No
PCT/EP 98/04406

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 9838291 A	03-09-1998	AU AU AU WO WO	6303698 A 6303798 A 6303898 A 9838319 A 9838320 A	18-09-1998 18-09-1998 18-09-1998 03-09-1998 03-09-1998	

		٠.

REPLACED BY ART 34 AMDT

5

15

30

35

Patent Claims

- 1. Use of bromelaine proteases for inhibiting blood coagulation.
- 2. The use according to claim 1, wherein the plasmin production is stimulated.
- 3. The use according to claim 1, wherein the production of fibrin is inhibited.
- 10 4. The use according to claim 1, wherein the adhesion of thrombocytes on endothelium cells is inhibited.
 - 5. The use according to one of the preceding claims, wherein the bromelaine proteases are basic bromelaine proteases.
 - 6. The use according to claim 5, wherein the basic bromelaine protease is a protease, having:
 - a molecular weight of about 24.4 KDa,
 - an optimal activity at a pH in the range of 4 to 5.5, and
- 20 comprising the following amino acid sequence:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

- 7. The use according to claim 5, wherein the basic bromelaine protease is a protease, having:
 - a molecular weight of about 24.5 KDa,
 - an optimal activity at a pH in the range of 3.5 to 5, and
 - comprising the following amino acid sequence:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

- 8. The use according to claim 5, wherein the basic bromelaine protease is a protease, having:
 - a molecular weight of about 23.4 KDa,
 - an optimal activity at a pH in the range of 6 to 8, and

			•
	·		
	:		

- comprising the following amino acid sequence:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Gly.

- 5
- 9. Medicament for inhibiting blood coagulation, characterized in that said medicament contains one or more bromelaine proteases.
- 10. Medicament according to claim 9, characterized in that said bromelaine proteases are basic bromelaine proteases.
 - 11. Medicament according to claim 9, characterized in that said bromelaine protease is a basic bromelaine protease selected from a protease according to one of the claims 6 to 8.
- 15 12. Medicament according to claim 9, characterized in that the bromelaine protease is a recombinant bromelaine protease.

			· · ·
,			
	÷		

PATENT COOPERATION TREA. .

	From the INTERNATIONAL BUREAU
PCT	То:
NOTIFICATION OF ELECTION	Assistant Commissioner for Patents
(200 D	United States Patent and Trademark
(PCT Rule 61.2)	Office Box PCT
	Washington, D.C.20231
	ETATS-UNIS D'AMERIQUE
Date of mailing (day/month/year)	in the second to the other of t
17 March 2000 (17.03.00)	in its capacity as elected Office
International application No.	Applicant's or agent's file reference
PCT/EP98/04406	P20241 Dr.Kö
International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
15 July 1998 (15.07.98)	
Applicant	
MAURER, Rainer et al	
The designated Office is hereby notified of its election mad	۵۰
The designated office is notedly notified of its closed in the	··
X in the demand filed with the International Preliminar	y Examining Authority on:
09 February 2	000 (09.02.00)
the second secon	
in a notice effecting later election filed with the Intere	national Bureau on:
2. The election X was	
<u> </u>	
was not	
made before the expiration of 19 months from the priority	date or, where Rule 32 applies, within the time limit under
Rule 32.2(b).	
the Company of the Co	
	Authorized officer
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes	F. Baechler
1211 Geneva 20, Switzerland	
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Copy for the Elected Office (EO/US)

PATENT COOPERATION TREA. /

		From tl	ne INTERNAT	IONAL BL	JREAU
PCT		To:			
		1	•		
NOTIFICATION OF THE RECORDING	i	670	ALIC Alexan	4	
OF A CHANGE			AUS, Alexand er, Kurig, Str		
(PCT Rule 92bis.1 and		Bava	riastrasse 7		9 TT 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
Administrative Instructions, Section 42	22)	,	336 Müncher	1	
		ALLE	MAGNE		
Date of mailing (day/month/year)		11			
17 March 2000 (17.03.00)		<u> </u>			
Applicant's or agent's file reference			IMPORTA	ANT NOTI	FICATION
P20241 Dr.Kö			<u> </u>		
International application No.		l	nal filing date (d		·
PCT/EP98/04406		15 J	uly 1998 (15.0	07.98)	and the property of the second
The following indications appeared on record cond	erning:				
the applicant the inventor	ī	the ager	ı 🗀	the commo	n representative
			State of Nation	nality	State of Residence
Name and Address STRAUS, Alexander				,	
Kirschner & Kuria			Telephone No.		<u> </u>
Sollner Strasse 38 D-81479 München		089/749 858-0 Facsimile No.			
Germany					
			089/749	858-11	DOMESTIC CONTRACTOR
			Teleprinter No		
					· · · ·
2. The International Bureau hereby notifies the application	cant that th	e following	change has bee	n recorded o	oncerning:
the person X the name X	the add	ress	the nationa	lity	the residence
Name and Address			State of Nation	nality	State of Residence
STRAUS, Alexander					
Becker, Kurig, Straus Bavariastrasse 7			Telephone No		
D-80336 München				303-0	4 ()
Germany			Facsimile No.		
			089/746		
			Teleprinter No).	
			حصصطا		
3. Further observations, if necessary: The indication of a new address of the a					
considered a request for recording a cha International Bureau should be notified			2bis. In case	of disagre	ement, the
4. A copy of this notification has been sent to:				====	
		1		ated Offices	-anarrad
X the receiving Office		į	=		
the International Searching Authority		ļ	===	Offices cond	cernea
X the International Preliminary Examining Author	ority		other:		
	1	Authorized	officer		
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes			F. F	Baechler	
1211 Geneva 20, Switzerland	}				
Facsimile No · (41-22) 740 14 35	1	Telephone	No - /41-221 338	82 38	

PATENT COOPERATION TREATY

JUN 2 0 2002

PCT

TECH CENTER 1600/2900

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

(7
•	J
•	~
	,

Applicant's or agent's file reference 80054 WO	FOR FURTHER ACTION	J	cation of Transmittal of Internationa Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP98/04406	International filing date (day 15 July 1998 (15.		Priority date (day/month/year)
International Patent Classification (IPC) or A61K 38/48	national classification and IPC		
Applicant L	JRSAPHARM ARZNEIM	IITTEL GMI	ВН
This international preliminary ex Authority and is transmitted to the			International Preliminary Examining
2. This REPORT consists of a total o	f6 sheets, include	ling this cover s	sheet.
been amended and are the		ts containing re	tion, claims and/or drawings which have ectifications made before this Authority the PCT).
These annexes consist of a	total of sheets.		
3. This report contains indications rel	ating to the following items:		
I Basis of the repo	п		•
II Priority			
III Non-establishme	nt of opinion with regard to nov	elty, inventive	step and industrial applicability
IV Lack of unity of	invention		
V Reasoned statem citations and exp	ent under Article 35(2) with reg lanations supporting such stater	ard to novelty, nent	inventive step or industrial applicability;
VI Certain documen	ts cited		,
VII Certain defects in	the international application		
VIII Certain observati	ions on the international applica	tion	
Date of submission of the demand	Date	of completion	of this report
09 February 2000 (09	.02.00)	06 C	October 2000 (06.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Auth	orized officer	
Facsimile No	Tolor	shone No	

All Christian

International application No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

PCT/EP98/04406

I. Basis of the	report		
1. This report under Articl	has been drawn of	on the basis of (Replacement sheet, in this report as "originally filed"	s which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):
	the international	application as originally filed.	
\boxtimes	the description,	pages 1-10	, as originally filed,
		pages	, filed with the demand,
			, filed with the letter of,
		pages	_, filed with the letter of
\boxtimes	the claims,	Nos.	, as originally filed,
		Nos.	, as amended under Article 19,
		Nos	, filed with the demand,
			, filed with the letter of
		Nos.	, filed with the letter of
	the drawings,	sheets/fig	_ , as originally filed,
		sheets/fig	_ , filed with the demand,
		sheets/fig	, filed with the letter of,
		sheets/fig	, filed with the letter of
2. The amend	ments have result	ed in the cancellation of:	
	the description,	pages	
	the claims,	Nos	
	the drawings,	sheets/fig	
			nendments had not been made, since they have been considered e Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
4. Additional	observations, if n	ecessary:	
•			
			,

	•	
	•	•
		•

International application No.

PCT/EP98/04406

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability					
The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:					
the entire international application.					
Claims Nos. 1-4					
because:					
the said international application, or the said claims Nos. 1-4 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):					
See annex					
the description, claims or drawings (indicate particular elements below) or said claims Nos are so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):					
the claims, or said claims Nos are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.					
no international search report has been established for said claims Nos.					

	-
	•
	1

International application No. PCT/EP 98/04406

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III.

1. In the opinion of the Examining Authority, Claims 1-8 concern subject matter that falls under PCT Rule 67.1(iv). Therefore, no expert opinion will be established concerning the industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).

Allens to che

		_
		•
		•
		·

International application No. PCT/EP 98/04406

V.	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
	citations and explanations supporting such statement

1. 5	Statement			
	Novelty (N)	Claims	1-6	YES
		Claims		NO
	Inventive step (IS)	Claims	1-6	YES
		Claims		NO
	Industrial applicability (IA)	Claims	5, 6; 1-8 (see supplemental sheet)	YES
		Claims		NO

- 2. Citations and explanations
 - 2. Reference is made to the following documents:
 - D1 = TAUSSIG, S. J., et al: "Bromelain, the enzyme complex of pineapple (Ananas comosus) and its clinical application. An update", JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, Vol. 22, No. 2, 1988, pp. 191-203, XP002097864
 - D2 = DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB;
 AN 89-019644, XP002097957 & JP-A-63 295 515 (KAO
 CORP), January 1988.
 - 3. Claims 1-4 satisfy the requirements of PCT Article 33(2) and (3) because their subject matter is novel and involves an inventive step (see below).

3.1 Novelty

None of the documents cited in the search report discloses the use for inhibiting blood coagulation of one or more of the basic bromelain proteases characterized by the features appearing in Claim 1 under a), b) and c). (These basic bromelain proteases are hereinafter designated bromelain proteases F4, F5 and F9.)

		·

D1, which is considered to be the closest prior art, discloses (see the abstract, for example) the use of bromelain to inhibit blood coagulation. It is also taught that bromelain acts fibrinolytically, inhibiting platelet aggregation. According to D1 (see page 195, lines 3-6) this effect correlates with bromelain's proteolytic activity.

Proceeding from D1, the present invention addresses the problem of finding components of the bromelain mixture that inhibit blood coagulation.

As proposed in the claims and supported by the experimental examples in the application, this problem is solved by the basic bromelain proteases F4, F5 and F9.

The basic bromelain protease F4, F5 and F9 are known from D2 (see the abstract, for example). However, D2 neither teaches nor suggests the possible use of these basic bromelain proteases to inhibit blood coagulation.

As set out in the application (see page 2, lines 26-30), it is possible to predict whether individual components in the isolated state are effective per se without other substances still present in the bromelain mixture, or whether they require as auxiliary substances additional components that are present in the bromelain mixture but not yet recognized. Based on the teaching of D1, a person skilled in the art could not therefore foresee that the basic bromelain proteases F4, F5, and F9 would solve the problem posed.

		• ,	
-			

PCT/EP 98/04406

- 4. Claims 5 and 6 do not satisfy the requirements of PCT Article 33(2) and 33(3). The reasons are the following:
 - As noted above, the basic bromelain proteases F4, F5 4.1 and F9 are already known from D2. D2 (see page 51, right-hand column, lines 1-8) also teaches that these basic bromelain proteases are effective against tumors. Hence, D2 implicitly teaches and clearly suggests the medical application of such proteases (in the form of a medicament).
 - 4.2 Medicaments containing the basic bromelain proteases F4, F5, and F9 are thus implicitly not novel with respect to D2 and, in any case, are not inventive. [It should be noted that a product is defined only in terms of its components, not its use.]
 - Claims 5 and 6 satisfy the criterion mentioned in 5. PCT Article 33(4) because their subject matter is industrially applicable.
 - PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing the industrial applicability of Claims 1-4 in their present form. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognize the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical application.

• • •	
	•
	- 2

International application No.

		ſ	PC1/EP98/04406
Certain documents cited			
Certain published documents (I	Rule 70.10)		
Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
Jon-written disclosures (Rule	70.9)		
Kind of non-written di	sclosure Date of non	-written disclosure remonth/year)	Date of written disclosure ferring to non-written disclosure (day/month/year)
See annex			

International application No. PCT/EP 98/04406

	-		
Sun	nlėm	ental	Rox

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI.

7. WO-A-98/38291 (priority: 25 February 1997, 28 February 1997, 25 March 1997; application date: 25 February 1998; publication date: 3 September 1998).

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders od	er Anwalts					
80054 WO	WEITERES VORGEH	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)				
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedat	ım(<i>Tag/Monat/Jahr</i>) Prioritätsdatum (<i>Tag/Monat/Tag</i>)				
PCT/EP98/04406	15/07/1998	15/07/1998				
Internationale Patentklassification (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K38/48						
Anmelder						
URSAPHARM ARZNEIMI	TTEL GMBH et al.					
	rläufige Prüfungsbericht wurde von de d dem Anmelder gemäß Artikel 36 üb	r mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte ermittelt.				
2. Dieser BERICHT umfaß	t insgesamt 6 Blätter einschließlich d	eses Deckblatts.				
Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).						
Diese Anlagen umfasse	n insgesamt 2 Blätter.					
Dieser Bericht enthält A	ngaben zu folgenden Punkten:					
l ⊠ Grundlage o	des Berichts					
II ☐ Priorität						
III 🖾 Keine Erste	llung eines Gutachtens über Neuheit,	erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit				
	Einheitlichkeit der Erfindung					
		ntlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der irungen zur Stützung dieser Feststellung				
VI 🗵 Bestimmte a	angeführte Unterlagen					
VII 🗆 Bestimmte l	Mängel der internationalen Anmeldun					
VIII 🗆 Bestimmte (Bemerkungen zur internationalen Ann	eldung				
Datum der Einreichung des Antr	ags C	atum der Fertigstellung dieses Berichts				
09/02/2000		5.10.2000				
Name und Postanschrift der mit Prüfung beauftragten Behörde:	der internationalen vorläufigen B	evollmächtigter Bediensteter				
Europäisches Patel D-80298 München	1	eris Antoli, B				
Fax: +49 89 2399 -	4465 T	el. Nr. +49 89 2399 8476				

		-
		,
,	,	
	<i>p</i>	,•
		•

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER **PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/04406

l.	Gru	ındla	ge d	es	Ві	ric	hts
----	-----	-------	------	----	----	-----	-----

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.): B schreibung, Seiten: ursprüngliche Fassung 1-10 Patentansprüche, Nr.: 07/08/2000 mit Schreiben vom 07/08/2000 1-6 eingegangen am 2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen: □ Beschreibung. Seiten: ☐ Ansprüche. Nr.: Blatt: ☐ Zeichnungen. 3. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)): 4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen: III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbark it Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist: die gesamte internationale Anmeldung. Ansprüche Nr. 1-4 (gewerbliche Anwendbarkeit). Begründung: Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 1-4 (gewerbliche

Anwendbarkeit) beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige

siehe B iblatt

Prüfung durchgeführt werden braucht (genaue Angaben):

		•	
		•	

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/04406

		Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (<i>machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben</i>) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (<i>genaue Angaben</i>):						
		Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.						
		Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.						
٧.	Beg gev	egründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und d rewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung						
1.	Fes	- eststellung						
	Neu	uheit (N)	Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1-6			
	Erfi	nderische Tätigkeit (ET)	Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1-6			
	Ge	werbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	5. 6: 1-8 (siehe Beiblatt)			
2.	Unt	terlagen und Erklärungen						
	sie	he Beiblatt						
۷I	VI. Bestimmte angeführte Unterlagen							
1.	. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)							

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

und / oder

siehe Beiblatt

			•
			, •
		•	

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Die Ansprüche 1-8 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- 2. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:
 - D1: TAUSSIG S J ET AL: 'Bromelain, the enzyme complex of pineapple (ananas comosus) and its clinical application. An update' JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, Bd. 22, Nr. 2, 1988, Seite 191-203 XP002097864
 - D2: DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-019644 XP002097957 & JP 63 295515 A (KAO CORP), Januar 1988
- 3. Die Ansprüche 1-4 erfüllen die Erfordernisse des Art. 33(2) und 33(3) PCT, weil ihr Gegenstand neu und erfinderisch ist (siehe unten).

3.1 Neuheit:

Keines der im Recherchenbericht zitierten Dokumente offenbart die Verwendung zur Hemmung der Blutgerinnung von einer oder mehreren der basischen Bromelainproteasen, die durch die Merkmale gekennzeichnet sind, die im Anspruchs 1 unter a), b) und c) dargelegten werden. (Diese basische Bromelainprotease werden von nun an als Bromelainproteasen F4, F5 und F9 genannt).

		,

3.2 Erfind rische Tätigk it:

D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart (siehe z.B. Zusammenfassung) die Verwendung von Bromelain zur Hemmung der Blutgerinnung. Es wird auch gelehrt, daß Bromelain fibrinolytisch wirkt und die Thrombozyten Aggregation hemmt. Gemäß D1 (siehe Seite 195, Zeilen 3-6) korreliert diese Wirkung mit der proteolitischen Aktivität des Bromelains.

Ausgehend von D1, ist die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe darin zu sehen, daß man Komponente des Bromelaingemisches auffindet, welche die Blutgerinnung hemmen.

Wie in den Ansprüchen vorgeschlagen und durch die experimentellen Beispiele der Anmeldung gestützt, wird diese Aufgabe mit den basischen Bromelain-proteasen F4, F5 und F9 gelöst.

Die basische Bromelainprotease F4, F5 und F9 sind aus D2 (siehe z.B. Zusammenfassung) bekannt. Die mögliche Verwendung dieser basischen Bromelainproteasen zur Hemmung der Blutgerinnung wird jedoch in D2 weder gelehrt noch nahegelegt.

Wie in der Anmeldung aufgeführt (siehe Seite 2, Zeilen 26-30), kann es nicht vorhergesagt werden, ob einzelne Komponenten im isolierten Zustand ohne andere, im Bromelaingemisch noch vorhandene zusätzliche Stoffe selbst wirksam sind, oder ob diese vielmehr zusätzliche, im Bromelaingemisch vorhandene, jedoch noch nicht erkannte Komponente als Hilfsstoffe benötigen. Anhand der Lehre aus D1 war es für den Fachmann daher nicht vorhersehbar, daß die basischen Bromelainproteasen F4, F5 und F9 die gestellte Aufgabe lösen würden.

- 4. Die Ansprüche 5 und 6 erfüllen nicht die Erfordernisse des Art. 33(2) und 33(3) PCT. Die Begründung dafür ist folgende:
- 4.1 Wie oben angemerkt, sind die basischen Bromelainproteasen F4, F5 und F9 aus D2 bereits bekannt. In D2 (siehe Seite 51, rechte Spalte, Zeilen 1-8) wird auch gelehrt, daß diese die basischen Bromelainproteasen gegen Tumoren wirksam

		•

- sind. Die medizinische Anwendung solcher Proteasen (in Form eines Arzneimittel) wird somit in D2 implizit gelehrt und deutlich nahegelegt.
- 4.2 Arzneimittel enthaltend die basischen Bromelainproteasen F4, F5 oder F9 sind daher, gegenüber D2 implizit nicht neu und in jedem Fall nicht erfinderisch. [Es wird angemerkt, daß ein Erzeugnis nur durch seine Bestandteile und nicht durch seine Verwendung definiert wird].
- Die Ansprüche 5 und 6 erfüllen das in Art. 33(4) PCT genannte Kriterium, weil ihr 5. Gegenstand gewerblich anwendbar ist.
- Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 6. 1-4 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

WO-A-98 38291 (Priorität: 25.02.97/28.02.97/25.03.97; Anmeldetag: 25.02.98; 7. Veröffentlichungstag: 03.09.98).

			,
		`	
-			

Anmelder:

Ursapharm Arzneimittel GmbH

Unser Zeichen:

80054 WO

Amtsaktenzeichen:

PCT /EP/98/04406

Patentansprüche

- 5 1. Verwendung von Bromelainproteinasen zur Hemmung der Blutgerinnung, wobei die Bromelainproteinasen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:
 - a) einer basischen Bromelainprotease, die
 - ein Molekulargewicht von etwa 24,4 KDa aufweist,
- ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 4 bis 5,5 besitzt, und - die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

15 und/oder

- b) einer basischen Bromelainprotease, die
 - ein Molekulargewicht von etwa 24,5 KDa aufweist,
 - ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 3,5 bis 5 besitzt, und
 - die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

und/oder

- c) einer basischen Bromelainprotease, die
 - ein Molekulargewicht von etwa 23,4 KDa aufweist,
 - ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 6 bis 8 besitzt, und
 - die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Gly

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Plasmin-bildung stimuliert wird.

20

10

25

30

		٦

- 3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Fibrin-Bildung gehemmt wird.
- 4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen gehemmt wird.
 - 5. Arzneimittel zur Hemmung der Blutgerinnung, wobei das Arzneimittel neben herkömmlichen Exzipienten und Hilfsmitteln aus einer oder mehreren Bromelainproteasen nach Anspruch 1 besteht.
 - 6. Arzneimittel, nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Bromelainprotease eine rekombinante Bromelainprotease ist.

15

10

5

		^	•
-			

GEBIET DES PATENTWESENS

Absender:

MIT DER INTERNAT ALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An: STRAUS, Alexander **BECKER-KURIG-STRAUS** MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG Bavariastrasse 7 BECKER KURIG STRAL DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN D-80336 München BAVARIASTRASSE 7 80336 MUNC PRÜFUNGSBERICHTS **ALLEMAGNE** (Regel 71.1 PCT) 0 9. Okt. 2000 Absendedatum 06.10.2000 (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 80054 WO WICHTIGE MITTEILUNG Internationales Aktenzeichen Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) PCT/EP98/04406 15/07/1998 15/07/1998 Anmelder

- 1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
- 2. Eine Kopie des Berichts wird gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
- 3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amts wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtem noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

URSAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH et al.

Europäisches Patentamt D-80298 München

Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d

Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Hundt, D

Tel. +49 89 2399-8042



			٠.	•

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Akten	zeicher	ı des	Anmelders oder Anwalts		siehe Mitteil	lung über die Übersendung des internationalen
8005	54 WC)		WEITERES VORGEHEN	vorläufigen	Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Intern	ational	es Ak	tenzeichen	Internationales Anmeldedatum(7	ag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)
PCT	/EP98	3/044	106	15/07/1998		15/07/1998
	K38/4		entklassification (IPK) oder i	nationale Klassifikation und IPK		
URS	SAPH	ARM	ARZNEIMITTEL GMI	3H et al.		
				fungsbericht wurde von der mi elder gemäß Artikel 36 übermi		onale vorläufigen Prüfung beauftragte
2. 1	Dieser	BEF	RICHT umfaßt insgesam	t 6 Blätter einschließlich diese	s Deckblatts.	
	ur Be	d/od hörd	er Zeichnungen, die geä	indert wurden und diesem Ber chtigungen (siehe Regel 70.16	cht zugrunde	itter mit Beschreibungen, Ansprüchen liegen, und/oder Blätter mit vor dieser tt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
			3			
3.	Dieser	Beri	cht enthält Angaben zu	folgenden Punkten:		
	1	\boxtimes	Grundlage des Berichts	\$		
	H		Priorität			
	111	\boxtimes			nderische Täti	gkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
	IV		· J			
	٧	\boxtimes	Begründete Feststellur gewerbliche Anwendba	ng nach Artikel 35(2) hinsichtlic arkeit; Unterlagen und Erklärur	h der Neuheit gen zur Stütz	, der erfinderische Tätigkeit und der ung dieser Feststellung
	VI	\boxtimes	Bestimmte angeführte	Unterlagen		
	VII		Bestimmte Mängel der	internationalen Anmeldung		
	VIII		Bestimmte Bemerkung	en zur internationalen Anmeld	ung	
Datu	ım der l	Einrei	chung des Antrags	Datur	n der Fertigstelli	ung dieses Berichts
09/0	02/200	00		06.10	.2000	
		auftrag	nschrift der mit der internation gten Behörde:	onalen vorläufigen Bevol	lmächtigter Bed	iensteter ()
	9))	D-8	opäisches Patentamt 0298 München +49 89 2399 - 0 Tx: 52365		s Antoli, B	
1	.—		· +49 89 2399 - 4465		. 40 90 2200	0.170

l. Gru	ındlage	des	Bericht	S
--------	---------	-----	---------	---

1.	Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.):								
	Bes	chreibung, Seiter	n:						
	1-10	1	ursprüngliche Fassung	,					
	Pate	entansprüche, Nr.	, :						
	1-6		eingegangen am	07/08/2000	mit Schreiben vom	07/08/2000			
2.			gen sind folgende Unterl	agen fortgefallen:					
		Beschreibung.	Seiten:						
		Ansprüche. Zeichnungen.	Nr.: Blatt:						
		Zeichhungen.	Diatt.						
3		angegebenen Gr	ohne Berücksichtigung (ünden nach Auffassung (ssung hinausgehen (Reg	der Behörde über der	lerungen erstellt word n Offenbarungsgehalt	en, da diese aus den in der ursprünglich			
4	. Etw	aige zusätzliche B	emerkungen:						
11	I. Kei	ne Erstellung ein	es Gutachtens über Ne	uheit, erfinderische	Tätigkeit und gewer	bliche Anwendbark i			
F	olaen	de Teile der Anme	eldung wurden nicht dara ätigkeit beruhend (nicht d	ufhin geprüft, ob die l	beanspruchte Erfindu	ng als			
		die gesamte inter	nationale Anmeldung.						
	Ø	Ansprüche Nr. 1-	4 (gewerbliche Anwendb	parkeit).					
Ε	Begrür	ndung:							
	Ø	Anwendbarkeit) l	rnationale Anmeldung, b oeziehen sich auf den na führt werden braucht (<i>ge</i>	chstehenden Gegen:	ten Ansprüche Nr. 1-4 stand, für den keine ir	(gewerbliche Iternationale vorläufige			
		si he B iblatt							

	Die Beschreibung, die Ansprüch oder die obengenannten Ansprü konnte (<i>genaue Angaben</i>):	e oder o che Nr.	die Zeichnur . sind so unk	igen (<i>machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben</i>) dar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden
	Die Ansprüche bzw. die obenge gestützt, daß kein sinnvolles Gu			Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung len konnte.
	Für die obengenannten Ansprüc	he Nr.	wurde kein i	nternationaler Recherchenbericht erstellt.
gev	verblichen Anwendbarkeit; Unt	ikel 35(erlager	(2) hinsichtli n und Erklär	ch der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der ungen zur Stützung dieser Feststellung
gev Fes	gründete Feststellung nach Art verblichen Anwendbarkeit; Unt ststellung uheit (N)	erlager Ja:	(2) hinsichtlin und Erklär Ansprüche Ansprüche	ch der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der ungen zur Stützung dieser Feststellung 1-6
gev Fes Ne	werblichen Anwendbarkeit; Unt	Ja: Nein: Ja:	n und Erklär Ansprüche	ungen zur Stützung dieser Feststellung
gev Fes Ne Erf	werblichen Anwendbarkeit; Unt ststellung uheit (N)	Ja: Nein: Ja: Nein: Ja:	n und Erklär Ansprüche Ansprüche Ansprüche	ungen zur Stützung dieser Feststellung 1-6

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Die Ansprüche 1-8 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- 2. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:
 - D1: TAUSSIG S J ET AL: 'Bromelain, the enzyme complex of pineapple (ananas comosus) and its clinical application. An update' JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, Bd. 22, Nr. 2, 1988, Seite 191-203 XP002097864
 - D2: DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-019644 XP002097957 & JP 63 295515 A (KAO CORP), Januar 1988
- 3. Die Ansprüche 1-4 erfüllen die Erfordernisse des Art. 33(2) und 33(3) PCT, weil ihr Gegenstand neu und erfinderisch ist (siehe unten).

3.1 Neuheit:

Keines der im Recherchenbericht zitierten Dokumente offenbart die Verwendung zur Hemmung der Blutgerinnung von einer oder mehreren der basischen Bromelainproteasen, die durch die Merkmale gekennzeichnet sind, die im Anspruchs 1 unter a), b) und c) dargelegten werden. (Diese basische Bromelainprotease werden von nun an als Bromelainproteasen F4, F5 und F9 genannt).

3.2 Erfinderische Tätigkeit:

D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart (siehe z.B. Zusammenfassung) die Verwendung von Bromelain zur Hemmung der Blutgerinnung. Es wird auch gelehrt, daß Bromelain fibrinolytisch wirkt und die Thrombozyten Aggregation hemmt. Gemäß D1 (siehe Seite 195, Zeilen 3-6) korreliert diese Wirkung mit der proteolitischen Aktivität des Bromelains.

Ausgehend von D1, ist die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe darin zu sehen, daß man Komponente des Bromelaingemisches auffindet, welche die Blutgerinnung hemmen.

Wie in den Ansprüchen vorgeschlagen und durch die experimentellen Beispiele der Anmeldung gestützt, wird diese Aufgabe mit den basischen Bromelainproteasen F4, F5 und F9 gelöst.

Die basische Bromelainprotease F4, F5 und F9 sind aus D2 (siehe z.B. Zusammenfassung) bekannt. Die mögliche Verwendung dieser basischen Bromelainproteasen zur Hemmung der Blutgerinnung wird jedoch in D2 weder gelehrt noch nahegelegt.

Wie in der Anmeldung aufgeführt (siehe Seite 2, Zeilen 26-30), kann es nicht vorhergesagt werden, ob einzelne Komponenten im isolierten Zustand ohne andere, im Bromelaingemisch noch vorhandene zusätzliche Stoffe selbst wirksam sind, oder ob diese vielmehr zusätzliche, im Bromelaingemisch vorhandene, jedoch noch nicht erkannte Komponente als Hilfsstoffe benötigen.

Anhand der Lehre aus D1 war es für den Fachmann daher nicht vorhersehbar, daß die basischen Bromelainproteasen F4, F5 und F9 die gestellte Aufgabe lösen würden.

- 4. Die Ansprüche 5 und 6 erfüllen nicht die Erfordernisse des Art. 33(2) und 33(3) PCT. Die Begründung dafür ist folgende:
- 4.1 Wie oben angemerkt, sind die basischen Bromelainproteasen F4, F5 und F9 aus D2 bereits bekannt. In D2 (siehe Seite 51, rechte Spalte, Zeilen 1-8) wird auch gelehrt, daß diese die basischen Bromelainproteasen gegen Tumoren wirksam

		• .

- sind. Die medizinische Anwendung solcher Proteasen (in Form eines Arzneimittel) wird somit in D2 implizit gelehrt und deutlich nahegelegt.
- 4.2 Arzneimittel enthaltend die basischen Bromelainproteasen F4, F5 oder F9 sind daher, gegenüber D2 implizit nicht neu und in jedem Fall nicht erfinderisch. [Es wird angemerkt, daß ein Erzeugnis nur durch seine Bestandteile und nicht durch seine Verwendung definiert wird].
- 5. Die Ansprüche 5 und 6 erfüllen das in Art. 33(4) PCT genannte Kriterium, weil ihr Gegenstand gewerblich anwendbar ist.
- 6. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 1-4 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Zu Punkt VI

Bestimmte angeführte Unterlagen

7. WO-A-98 38291 (Priorität: 25.02.97/28.02.97/25.03.97; Anmeldetag: 25.02.98; Veröffentlichungstag: 03.09.98).

		9

Anmelder:

Ursapharm Arzneimittel GmbH

Unser Zeichen:

80054 WO

Amtsaktenzeichen:

PCT /EP/98/04406

Patentansprüche

- Verwendung von Bromelainproteinasen zur Hemmung der Blutgerinnung, wobei die Bromelainproteinasen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:
 - a) einer basischen Bromelainprotease, die
 - ein Molekulargewicht von etwa 24,4 KDa aufweist,
- ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 4 bis 5,5 besitzt, und
 die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

15 und/oder

20

25

30

- b) einer basischen Bromelainprotease, die
 - ein Molekulargewicht von etwa 24,5 KDa aufweist,
 - ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 3,5 bis 5 besitzt, und
 - die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Asn

und/oder

- c) einer basischen Bromelainprotease, die
 - ein Molekulargewicht von etwa 23,4 KDa aufweist,
 - ein Optimum der Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 6 bis 8 besitzt, und
 - die folgende Aminosäuresequenz umfaßt:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser Gly Ala Val Thr Ser Val Lys Asn Gln Gly

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Plasmin-bildung stimuliert wird.

^ • . •

- 3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Fibrin-Bildung gehemmt wird.
- 4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen gehemmt wird.
 - 5. Arzneimittel zur Hemmung der Blutgerinnung, wobei das Arzneimittel neben herkömmlichen Exzipienten und Hilfsmitteln aus einer oder mehreren Bromelainproteasen nach Anspruch 1 besteht.
 - 6. Arzneimittel, nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Bromelainprotease eine rekombinante Bromelainprotease ist.

15

10

		°•, ,
	•	